

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-102002
(43)Date of publication of application : 18.04.1995

(51)Int. Cl. C08B 37/08
A61K 47/36
// A61K 9/00

(21)Application number : 05-245072 (71)Applicant : GUNZE LTD
KAKEN PHARMACEUT CO LTD
(22)Date of filing : 30.09.1993 (72)Inventor : IKADA YOSHITO
TABATA YASUHIKO
OKA TAKASHIGE
TOMIHATA KENJI

(54) CROSS-LINKED HYALURONIC ACID AND COMPOUND MATERIAL THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a cross-linked hyaluronic acid material improved in respect of toxicity and gel strength and having a high strength and a variety of decomposition and absorption rates, by mixing an aq. soln. of hyaluronic acid with a carbodiimide and drying the aq. soln. to introduce therein cross-linkages.

CONSTITUTION: An aq. soln. of hyaluronic acid is mixed with a carbodiimide, and then dried to introduce therein cross-linkages to thereby obtain the desired cross-linked hyaluronic acid material. The mol.wt. of hyaluronic acid to be used is usually about 106 to 2×10^6 . Hyaluronic acid may be used either in the form of a free acid or in the form of a salt of an alkali metal such as sodium or potassium, or an alkaline earth metal such as calcium or magnesium. The carbodiimide is desirably a water-soluble carbodiimide from the viewpoint of removal treatment thereof during and after the cross-linking reaction, though a carbodiimide soluble only in an org. solvent, such as dicyclohexylcarbodiimide, may instead be used.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.05.2000
[Date of sending the examiner's decision
of rejection]
[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-102002

(43) 公開日 平成7年(1995)4月18日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/08	Z	7433-4C		
A 6 1 K 47/36	C			
	B			
// A 6 1 K 9/00	G			
	H			

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-245072

(22) 出願日 平成5年(1993)9月30日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年5月12日
社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集 42巻
[1993]」に発表

(71) 出願人 000001339

グンゼ株式会社
京都府綾部市青野町膳所1番地

(71) 出願人 000124269

科研製薬株式会社
東京都文京区本駒込2丁目28番8号

(72) 発明者 筏 義人

京都府宇治市五ヶ庄広岡谷2-182

(72) 発明者 田畑 泰彦

京都府宇治市琵琶台3-8-16

(74) 代理人 弁理士 三枝 英二 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 架橋ヒアルロン酸及びこれらの複合材料

(57) 【要約】

【構成】 架橋処理されたヒアルロン酸と生体分解性補強材または高分子量生物活性薬物を複合化してなる架橋ヒアルロン酸複合材料、架橋処理されたヒアルロン酸およびその製造方法。

【効果】 有用な架橋ヒアルロン酸およびその複合材料を提供できるようになった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒアルロン酸水溶液にカルボジイミドを混合し、その水溶液を乾燥させて架橋を導入することによる架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項2】ヒアルロン酸水溶液にカルボジイミドとともに、ジアミノ基をもつアミノ酸またはそのメチルエステルあるいはエチルエステルを加え、水溶液を乾燥させる架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項3】ヒアルロン酸水溶液のpHが4～8である請求項1または2に記載の架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項4】未架橋の水溶性ヒアルロン酸材料を、カルボジイミドを含有する有機溶媒に加える架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項5】未架橋の水溶性ヒアルロン酸材料および塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸メチルエステルまたは塩基性アミノ酸エチルエステルを、カルボジイミドを含有する有機溶媒に加える架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項6】有機溶媒が、ヒアルロン酸が殆んどあるいは全く溶解しない水溶性有機溶媒であり、これが60～100%と水40～0%からなる請求項4または5に記載の架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項7】反応温度が、4～45℃である請求項4～6のいずれかに記載の架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項8】請求項1～7のいずれかの方法を行った後、架橋ヒアルロン酸材料を酸性水溶液に浸漬させることにより、残存するカルボジイミドを尿素誘導体に変換する架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項9】請求項1～7のいずれかの方法を行った後、架橋ヒアルロン酸材料を酸性水溶液に浸漬させることにより、残存するカルボジイミドを尿素誘導体に変換し、次いで架橋ヒアルロン酸材料を水洗する架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項10】カルボジイミドが水溶性カルボジイミドである請求項1～9のいずれかに記載の架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項11】ヒアルロン酸水溶液に、ジまたはポリ官能性エポキシ化合物を混合し、その水溶液を乾燥させて架橋を導入する架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項12】ヒアルロン酸水溶液のpHが4～8である請求項11に記載の架橋ヒアルロン酸材料の製造方法。

【請求項13】架橋ヒアルロン酸材料と生体分解吸収性補強材料複合化してなる架橋ヒアルロン酸複合材料。

【請求項14】架橋ヒアルロン酸材料に、生理活性物質を含有させてなる生理活性物質の徐放化剤。

【請求項15】フィルム状のヒアルロン酸材料を請求項1～12のいずれかの方法により架橋処理してなる架橋

ヒアルロン酸材料。

【請求項16】37℃のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で、2～30日後に可溶性になる架橋ヒアルロン酸材料。

【請求項17】生体内で5日以上不溶性である請求項15または16に記載の架橋ヒアルロン酸材料。

【請求項18】重量含水率が50～95%である架橋ヒアルロン酸材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医療用素材として適用される架橋されたヒアルロン酸、および架橋ヒアルロン酸を含有する複合材料とその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術およびその問題点】ヒアルロン酸は、生体の疎水性結合組織のグルコサミノグリカン(ムコ多糖)の1つとして極めて重要な素材である。このヒアルロン酸は、現在眼科用粘弾性材料および関節炎治療薬として臨床応用されているが、さらにその高含水性や潤滑性から外科手術の際の癒着防止材料としての利用も試みられている。しかしながら、ヒアルロン酸は水溶性高分子であるため、一定の形態を保てない。また、生体材料として用いるには分解吸収速度が速すぎる。そのため、そのままの形態で用いることは困難であり、架橋の導入が必要となる。

【0003】従来より、ヒアルロン酸の架橋に関しては、いくつかの報告がなされている。例えば、USP 4,605,691(1986)で、E.A.Balzsらはジビニルスルホン(DVS)を用いた架橋方法を示している。また、PCT W086/00079(1986)でMalson T.は、ブタンジオールグリシジルエーテル(BDDE)を用いて架橋を行っている。さらに、N.Yuiらは、J.Controlled Release, 25, 133-143(1993)などで、ポリグリシジルエーテルで架橋反応が行えることを示している。しかしながら、いずれの方法も高濃度のアルカリ溶液中にて反応を行っており、反応終了後のアルカリの除去が問題となる。さらに、DVSはそれ自体の毒性が高く、医療用素材として用いるには好ましくない。また、いずれも高含水率で強度が低く、そのため分解の速いゲルしか得られていない。従って、癒着防止材料などとして実際に利用可能な架橋ヒアルロン酸材料は得られていないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記の従来法においては、架橋ヒアルロン酸材料を得ることは可能であっても、生体材料として用いるためには、その毒性やゲル強度についての課題は解決しておらず、その点の改善が特に望まれるところであった。

【0005】本発明は、かかる毒性の課題はもとより、強度が高く、加えて多様な分解吸収速度を有する新規な

架橋ヒアルロン酸材料およびその製造方法、並びにこれらの複合材料を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、架橋反応条件を選択することにより、様々な特性をもつことを特徴とする架橋ヒアルロン酸材料を提供するものである。

【0007】本発明において、ヒアルロン酸の架橋反応に用いる架橋試薬はカルボジイミドであり、その中でも最も好ましい1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)は、従来タンパク質の架橋の際、カルボキシル基とアミノ基の間のペプチド結合を形成させる架橋試薬として用いられてきた。ところが、ヒアルロン酸にはカルボキシル基はあるもののアミノ基は存在しない。しかしながら、本発明においては、ヒアルロン酸のカルボキシル基どうしによる酸無水物の形成、あるいはカルボキシル基と水酸基間のエステル結合形成による架橋ヒアルロン酸の作製が、EDCを用いて可能であることを明らかにした。EDCは、従来用いられてきた架橋試薬に比べて毒性はるかに低く、反応終了後は毒性の低い尿素誘導体に変換され、架橋材料中には残留しない。また、残留した活性のあるEDCも酸性下、特にpH2~4の水と接触させることにより、毒性の低い尿素誘導体に変換させることができる。さらに、EDCも尿素誘導体ともに水溶性であることから、水洗により容易に除去できる。その洗浄度は、材料中の窒素量を定量することにより確認できる。このことから、EDCを生体材料に利用するとき、安全であるという大きな特徴をもつ。

【0008】ヒアルロン酸水溶液にEDCなどの水溶性カルボジイミドを加えて架橋反応を行うとき、その水溶液のpHを4~8、好ましくはpH4.5~6にすることにより、架橋ヒアルロン酸材料が得られる。また、加えるEDCなどの水溶性カルボジイミドの量あるいは乾燥時間を変化させることにより、50~95%と広い範囲の含水率をもつ架橋ヒアルロン酸材料が得られる。

【0009】水溶性高分子であるヒアルロン酸の架橋反応は、従来まで上述のように、ヒアルロン酸に直接架橋試薬を混合することにより行っていたが、カルボジイミド、特に水溶性カルボジイミド(WSC)、最も好ましくはEDCを含有する水と有機溶媒、最も好ましくはエチルアルコールと水との混合溶媒中で架橋反応を行うことにより、未架橋のヒアルロン酸のフィルム、ゲルなどを出発材料として架橋反応を行えることを明らかにした。この有機溶媒としては、アセトンなどのケトン類、メタノール、エタノールなどのアルコール類などのヒアルロン酸がほとんどあるいは全く溶解しない水溶性有機溶媒が挙げられる。この際の水と有機溶媒の混合比率は、通常、水：有機溶媒=0~50重量%：100~50重量%、好ましくは25~20重量%：75~80重量%である。また、反応温度は4~45℃、好ましくは

20~30℃であり、反応時間は15~30時間である。未架橋のヒアルロン酸フィルムを用いる場合には、該フィルムを例えば溶媒に浸漬することにより行うことができる。この反応を行う際に、EDCとともに、ジアミノ基を有するアミノ酸、すなわちリジンまたはアルギニン、またはそれらのメチルあるいはエチルエステルを加えることにより、ヒアルロン酸のカルボキシル基との間にペプチド結合による架橋が形成される。この場合、架橋剤としてのリジンまたはアルギニン、またはそれらのメチルあるいはエチルエステルが架橋ヒアルロン酸材料に結合して存在することになるが、これらは生体由来の物質であり、生体にとって無害である。この反応を行う際に、水と有機溶媒との混合比率、EDCや架橋剤としてのリジンまたはアルギニンまたはそれらのメチルあるいはエチルエステルの濃度、反応温度、反応時間を変化させることにより、従来方法では得られなかったような低含水率の架橋ヒアルロン酸材料が本発明によって得られるようになった。

【0010】架橋反応におけるヒアルロン酸水溶液のpHを4~8、好ましくは4.5~6に調整する。このヒアルロン酸水溶液に、種々の濃度のジもしくはポリ官能性エポキシ化合物を加え、乾燥させることによって架橋ヒアルロン酸材料の得られることを本発明は明らかにした。エポキシ化合物の使用量は、特に限定されるものではないが、通常ヒアルロン酸1gに対し、5μmol~5mmol程度の量を用いる。水溶液の乾燥工程は：温度4~50℃、好ましくは20~30℃；湿度30~60%、好ましくは35~50%の条件下で、1~72時間乾燥させる。乾燥は、攪拌が困難になるまで行う。従来は、アルカリ性下でジもしくはポリ官能性エポキシ化合物を加えることにより架橋ゲルを作製していたが、本発明の方法では反応時間を長くすることにより弱酸性から中性領域、即ち、pHを4~8、好ましくは4.5~6において、架橋反応がより高度に進行することを明らかにした。また、ヒアルロン酸水溶液のpH、乾燥時間、また、加えるジもしくはポリ官能性エポキシ化合物の濃度を変化させることにより、含水率が50~95%の低くかつ広い範囲の架橋ヒアルロン酸材料が得られる。これは、従来法では96~99%という狭くかつ高い範囲の架橋ヒアルロン酸材料しか得られなかったのと比較して、大きな特徴である。

【0011】本発明はさらに、架橋ヒアルロン酸と生体内分解吸収性補強材料を複合化することを特徴とする架橋ヒアルロン酸複合材料を提供する。この補強材料となる生体内分解吸収性材料としては、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸(PLA)、ポリカプロラクトン(PCL)、p-ポリジオキサン、キチン、キトサンなどの単一重合体、あるいはこれらの共重合体が挙げられる。これらは、単独で、または2種以上を組み合わせ

は不織布の形態で架橋ヒアルロン酸中に埋入するか、またはこれらの形態の補強材料を架橋ヒアルロン酸と貼り合わせることで複合化し、架橋ヒアルロン酸複合材料を得ることができる。架橋ヒアルロン酸と生体内分解吸収性補強材料の配合比率は、架橋ヒアルロン酸1重量部に対して生体内分解吸収性補強材料0.1~10重量部である。

【0012】本発明の架橋ヒアルロン酸に、生理活性物質を含有させることもできる。ここで、「生理活性物質」としては、高分子量生理活性物質および医薬品が挙げられる。生理活性物質を含有させる方法としては、ヒアルロン酸の架橋反応を行う際に、生理活性物質を共存させることにより、架橋ヒアルロン酸内部に閉じ込める、または架橋ヒアルロン酸に生理活性物質を含浸させることにより、複合化架橋ヒアルロン酸材料を得ることができる。架橋ヒアルロン酸材料に複合させることのできる高分子量生理活性物質として、ヘパリン、細胞増殖因子、また医薬品として種々の抗生物質や抗菌剤を例示することができる。これらの物質を複合化させることにより抗血栓性の付与、癒着防止能の増加、創傷治癒の促進、感染症の予防などの機能が付与される。架橋ヒアルロン酸と生理活性物質の配合比率は、架橋ヒアルロン酸10~100重量部に対して生理活性物質0.05~5重量部である。

【0013】本発明の製造方法で用いるヒアルロン酸の分子量は、特に限定されるものではないが、通常 $10^6 \sim 2 \times 10^6$ 程度である。ヒアルロン酸は、遊離の酸の形態で用いてもよく、また、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属塩、またはカルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩であってもよい。

【0014】本発明で用いるカルボジイミドは、通常用いられるカルボジイミドを用いることができる。ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のような有機溶媒にしか溶解しないものでも利用できるが、架橋反応時及び反応後の除去処理の点から水溶性カルボジイミド(WSC)を用いることが望ましい。このようなWSCとして、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-N-メト-p-トルエン硫酸塩(CMC)などを例示することができる。WSCは、水溶液中でも含水有機溶媒中でも使用でき、一方DCCは、含水アルコール中で使用するのが好ましい。WSCによるヒアルロン酸の架橋反応時に共存させることのできる架橋物質として、ジアミノ基をもつアミノ酸およびそのメチルまたはエチルエステルが挙げられ、具体的にはL-リジン、L-アルギニン、L-リジンメチルエステル、L-アルギニンメチルエステル、L-リジンエチルエステル、L-アルギニンエチルエステルなどである。

【0015】ジまたはポリエポキシ化合物としては、水

溶性の点からジエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルが挙げられる。

【0016】本発明において、pHの調節は塩酸、硫酸などの酸及び水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの塩基を用いて行ってもよく、適当な緩衝液中で反応を行ってもよい。

【0017】

【実施例】以下本発明を、実施例を用いてより詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことはいうまでもない。

【0018】

【実施例1】分子量 1.6×10^6 のヒアルロン酸ナトリウム塩粉末を、1重量%濃度となるように蒸留水中に溶解させ、該溶液をガラス板上に流延して風乾し、未架橋のヒアルロン酸フィルムを得た。

【0019】一方、これとは別に、エタノール濃度が各々70、80、90重量%であるエタノール-水混合溶液を作製し、この中にEDCをその濃度が100mMとなるよう溶解させ、架橋浴を調製した。

【0020】かかる架橋浴に、前記の未架橋ヒアルロン酸フィルムを浸漬し、25℃で24時間反応させ、次いでそれを蒸留水で十分洗浄して架橋されたヒアルロン酸フィルムを得た。

【0021】これらの3種類の架橋ヒアルロン酸フィルムの架橋度をリン酸緩衝生理食塩水(PBS; pH7.4)に37℃にて1晩浸漬し、その膨潤度から推定した。ここでいう膨潤度は湿重量/乾重量であり、その値が小さいほど、架橋度が高く、また、逆に大きいほど架橋度の低いことを意味する。また、架橋度が高いほどその分解が遅く、初期強度も強度保持性も高く、物質透過性は低い。

【0022】エタノール濃度90%水溶液中で架橋したヒアルロン酸架橋体はPBS水溶液中に溶解したが、それ以外のものは溶解せず、エタノール濃度が80%では2.42、70%では11.9の膨潤度を示した。

【0023】

【実施例2】実施例1で調製したエタノール濃度が70、80、90重量%であるエタノール-水混合溶液に、EDCをその濃度が100mMとなるよう溶解させ、さらにL-リジンメチルエステルをその濃度が25mMになるように添加して架橋浴を調製した。

【0024】かかる架橋浴に実施例1で用いた未架橋ヒアルロン酸フィルムを浸漬し、25℃で24時間反応させ、次いでこれをPBS(pH7.4)で十分洗浄して架橋ヒアルロン酸フィルムを得た。

【0025】このようにして得られた3種類の架橋ヒアルロン酸フィルムをPBS(pH7.4)に37℃にて1晩浸漬し、その膨潤度を測定したところ、エタノール濃度が90%のものは110.28; 80%のものは

7

2.31; 70%のものは2.98と実施例1に比べて低い膨潤度を示した。

【0026】

【実施例3】濃度が1重量%である30gのヒアルロン酸ナトリウム塩水溶液のpHを4.75に調整し、これにEDCを1.23mmol加えた試料を2つ準備し、その一方にはL-リジンを、また他方にはL-リジンメチルエステルを各々0.2mM濃度になるように添加し、反応液を十分に攪拌してゲルを得た。

【0027】これをガラス板上に置き、風乾して架橋フィルムを得、PBS (pH 7.4) によって洗浄した後、その膨潤度を測定した。その結果、L-リジンを添加した架橋体の膨潤度は26.3、L-リジンメチルエステルを添加した架橋体の膨潤度は98.0であった。なお、L-リジンメチルエステルを用いた場合は、反応開始後12時間でゲルが生成し、これを乾燥してフィルムを得た。

【0028】

【実施例4】pH 9.0の1重量%ヒアルロン酸水溶液1g当たりのエポキシ濃度が0.0625mmol、0.125mmolになるように、1重量%ヒアルロン酸水溶液80g (含有ヒアルロン酸: 0.8g) にデナコールEX-810 (ナガセ化成株式会社製: 商品名) を各々加え、良く攪拌した後、ガラス板上に流延し、風乾して架橋フィルムを得た。該架橋フィルムを蒸留水で十分洗浄し、その膨潤度を測定した。その結果、膨潤度はエポキシ濃度が0.0625mmolのものは5.24、0.125mmolのものは4.04であった。

【0029】

【実施例5】1重量%のヒアルロン酸水溶液のpHを、0.1規定の塩酸を加えることによって4.75に調整した。これにヒアルロン酸ナトリウム塩1g当たりエポキシ濃度が0.02mmol、0.04mmol、0.06mmol、0.08mmolになるように1重量%ヒアルロン酸水溶液80g (含有ヒアルロン酸: 0.8g) にデナコールEX-810を加えた。この水溶液を攪拌した後、ガラス板上に流延し、風乾して架橋フィルムを得た。該架橋フィルムを蒸留水で十分洗浄し、その膨潤度を測定した。

【0030】その結果、膨潤度はエポキシ濃度が0.02mmolでは11.8; 0.04mmolでは4.43; 0.06mmolでは3.29; および0.08mmolでは3.14であった。

【0031】

【実施例6】濃度が1重量%である200gのヒアルロン酸ナトリウム塩水溶液のpHを4.75に調整し、これにEDCを1.23mmol、L-リジンメチルエステルを0.395mmol添加し、攪拌してゲルを得た。このゲルの約60gをタテ10cm、ヨコ20cm、高さ1.5cmのプラスチック容器に入れた後、その上より生体

8

内分解性補強剤であるポリグリコール酸(PGA)で編成したタテ×ヨコが10×20cmの編生地(メリヤス平編生地)を置き、上部より残りのゲルを流し込み、4℃にて24時間架橋反応を行った。反応終了後、約37℃のpH 2.5の塩酸水溶液中に1時間浸漬し、さらに蒸留水にて洗浄した後風乾した。風乾後架橋ヒアルロン酸層の間にPGA系による編生地がサンドイッチ状に挟持された架橋ヒアルロン酸ポリグリコール酸複合化フィルムを得た。

【0032】

【実施例7】実施例4と同様の方法で架橋ヒアルロン酸フィルムを得た。50μgの塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)を含むPBS水溶液(pH 6.0)をフィルム10mgへ含浸させ、bFGFを包含した架橋ヒアルロン酸ハイドロゲルフィルムを得た。このハイドロゲルフィルムをマウスの背部皮下に埋入した。コントロールとして50μgのbFGFを含む水溶液を皮下投与、並びにbFGFを包含していない架橋ヒアルロン酸ハイドロゲルフィルムの皮下埋入を行った。1週間後、ゲル埋入または水溶液投与部位を調べたところ、bFGF含有ハイドロゲルの場合のみ埋入部位での血管新生が見られた。これは、bFGFをハイドロゲルに包含して除酸化することにより、bFGFの生理活性が有効に発現されたためであると考えられる。

【0033】

【実施例8】上記の実施例2に準じ、エタノール80%—水20%の混合水溶液中に、EDCの濃度が10mmol、L-リジンメチルエステルの濃度が3mmolとなるように混合し、未架橋ヒアルロン酸フィルムを、25℃にて24時間浸漬させることにより架橋ヒアルロン酸フィルムを作製した。このフィルムをPBS水溶液(pH 7.4)中に37℃にて浸漬させたところ、8日間で加水分解された。

【0034】

【実施例9】上記の実施例8に示した架橋ヒアルロン酸フィルムを、エチレンオキシドガスにて滅菌した後、10週齢のウィスター系の雄のラットの背部皮下に埋入した。埋入した架橋ヒアルロン酸材料の重量残存率は、5日後で87.4%、9日後で58.2%、14日後で7.2%であった。また、炎症反応は観察されなかった。

【0035】

【実施例10】上記実施例4及び5に準じ、1重量%のヒアルロン酸水溶液のpHを4.7あるいは8に調整し、ヒアルロン酸1gあたりエポキシ基濃度が10および100μmolとなるようにデナコールEX-810を加え、十分攪拌した後乾燥させることにより架橋ヒアルロン酸フィルムを得た。このフィルムをPBS中に37℃にて浸漬させ、一定期間後に取り出して重量残存率を測定した。pH 8のヒアルロン酸水溶液より得られ

た架橋フィルムは、 $10\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋した場合5日後で完全に溶解し、そのとき $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋した場合では、その残存重量率は20%であった。10日後で $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は5%であった。一方、pH 4.7のヒアルロン酸水溶液より得られた架橋フィルムは、 $10\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋した場合、5日後で完全に溶解し、 $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は90%であった。10日後で $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は60%であった。

【0036】

【実施例11】上記実施例10に準じ、1重量%のヒアルロン酸水溶液のpHを5に調整し、エポキシ基濃度がヒアルロン酸1gあたり10および $100\mu\text{mol}$ のデナコールEX-810を加え、十分混合した後に乾燥させることにより架橋ヒアルロン酸フィルムを得た。これをエチレンオキシドガスにて滅菌した後に、10週齢のウィスター系の雄のラットの背部皮下に埋入した。 $10\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は2日後で86.6%、 $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は2日後で89.2%であった。 $10\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は5日後で44.6%、 $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は5日後で74.

1%であった。また、 $10\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋した場合7日後で完全に分解吸収され、 $100\mu\text{mol/g}$ の濃度で架橋したフィルムの残存重量率は7日後で70.8%であった。いずれも強い炎症反応は観察されなかった。

【0037】

【発明の効果】本発明によれば、架橋剤の種類、濃度、処理温度、時間等その条件の選択によって従来よりも有意に強度の大きい、且つ、任意の架橋度のヒアルロン酸を得ることができ、これにより、その用途に対応した分解速度、初期強度、強度保持性、物質透過性等を有するヒアルロン酸架橋物が得られる。また、特に、毒性の面においては、水溶性カルボジイミド自体水溶性で、且つ、酸処理によって毒性のない尿素誘導体になること、アミノ酸、ジエポキシ化合物自体にも問題となる毒性を有しないことから、特に、これをフィルム状物としたときは癒着防止膜、やけど等の被覆材として有用である。さらに、これをゲル状物としたときは人工晶子体、関節の潤滑材等の医療用途に好適に用いることができる。

【0038】さらに、ヒアルロン酸架橋物と生体分解吸収性補強材料または生理活性物質を複合化すれば、かかるヒアルロン酸架橋物の機能をさらに改善することができる。

【0039】

フロントページの続き

(72)発明者 岡 高茂

京都府綾部市井倉新町石風呂1番地 グン
ゼ株式会社京都研究所内

(72)発明者 富畑 賢司

京都府綾部市井倉新町石風呂1番地 グン
ゼ株式会社京都研究所内